

Aus der medizinischen Universitätspoliklinik, Basel
Prof. Dr. med. A. Gigon

**Photometrische Untersuchungen
über die Zuckerpermeabilität der roten Blutkörperchen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Universität
BASEL

Vorgelegt von
TSCHAU-TJIÄN YANG
von Siangtan (Hunan), China

1950
Druck von Benno Schwabe & Co.
Basel

Aus der medizinischen Universitätspoliklinik, Basel
Prof. Dr. med. *A. Gigon*

**Photometrische Untersuchungen
über die Zuckerpermeabilität der roten Blutkörperchen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät der Universität
BASEL

Vorgelegt von
TSCHAU-TJIÄN YANG
von Siangtan (Hunan), China

1950
Druck von Benno Schwabe & Co.
Basel

Von der medizinischen Fakultät Basel genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. *A. Gigon*

Tag der Promotion: 15. August 1949



Sonderabdruck
aus der Schweizerischen Medizinischen Wochenschrift
80. Jahrgang 1950, Nr. 43, Seite 1157

I. Einleitung

Seit langem ist es bekannt, daß die Zuckerpermeabilität der roten Blutkörperchen von Tierart zu Tierart verschieden ist. *Rona* und *Michaelis* (1909), *Masing* (1912), *Kozawa* (1914), *Bönniger* (1920) und *Ege* (1921) stellten fest, daß die Erythrocyten von Gans, Schwein, Hammel, Rind, Ziege, Pferd, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen und wahrscheinlich auch vom Hund für Traubenzucker und sogar für sämtliche Monosaccharide undurchlässig sind. Dagegen erwiesen sich die Erythrocyten von Menschen und Affen sowohl auf Grund der chemischen Analyse über die Verteilung des Zuckers zwischen Blutkörperchen und Plasma als auch mit Rücksicht auf ihr osmotisches Verhalten für Traubenzucker und alle Monosaccharide als durchlässig. Der am meisten interessierende Punkt, die Durchlässigkeit der menschlichen Erythrocyten für Traubenzucker, ist neuerdings von vielen Autoren durch osmotische Versuche bestätigt worden. Alle beobachteten, daß das Volumen von menschlichen Erythrocyten in isotonischer Traubenzuckerlösung sowie in allen Monosacchariden zunahm, währenddem es in den Lösungen von Di- und Polysacchariden gleich blieb. Das Volumen des Blutes der übrigen Säugetiere, mit Ausnahme desjenigen der Affen, blieb in Lösungen aller Zuckerarten konstant. Das menschliche Blut nimmt in dieser Beziehung also eine Sonderstellung ein.

II. Methodik

In den letzten Jahren haben viele Autoren die optischen Methoden zur Messung der Permeabilität und der Hämolyse einer Blutsuspension angewendet. *Jacob* (1930) benützte einen Schicht-

dickenkolorimeter, *Pouder* (1934) eine Vakuumphotozelle, *Netter* und *Orskow* (1932) eine Speerschichtenphotozelle, *Wilbrandt* (1938) eine verbesserte Speerschichtenphotozelle und einen Vorlesungsgalvanometer. Wir haben bei unserem Verfahren das Pulfrich-Photometer verwendet. *L. Jendrassik* und *I. Andik* (1943) stellten bei optischer Messung der Lichtabsorption einer Blutkörperchensuspension fest, daß die mit isotonischen Lösungen hergestellten Blutveränderungen von gleicher Blutkörperchenzahl charakteristische Extinktionswerte ergeben. Diese Werte hängen allerdings von der Größe der Erythrocyten ab.

1. *Messung der Permeabilität.* Unser Verfahren bei Permeabilitätsuntersuchungen ist folgendes:

a) Blutentnahme: Mit einer Sahli-Hb.-Pipette gibt man genau 20 mm³ Blut in 1 cm³ isotonische NaCl-Na.citric.-Lösung (0,72 g NaCl + 0,71 g Na.citric./cm³) (Lösung A). Gleichzeitig mit der Blutentnahme werden die Erythrocyten gezählt.

b) Isotonische Zuckerlösungen: Diese Lösung muß jedesmal frisch hergestellt werden, z. B. isotonische Lösungen von:

Glukose	C ₆ H ₁₂ O ₆	5,4%	Xylose	C ₅ H ₁₀ O ₅	4,5%
Saccharose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	10,2%	Lactose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ · 1 H ₂ O	10,8%
Lävulose	O ₆ H ₁₂ C ₆ , H ₂ O	5,9%	Maltose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ · 1 H ₂ O	10,8%

c) Blutsuspension: Die Lösung A wird durch Zuckerlösung (2) verdünnt, bis 1 cm³ der Blutsuspension 5000 Erythrocyten enthält. Die Temperatur der Suspension muß konstant sein (Brutschrank).

d) Photometrische Untersuchung: Nach sorgfältigem Vermengen mißt man die Extinktion der Blutsuspension in einer Cuvette von 3 cm Schichtdicke und mit einem Filter S₇₂ am Photometer. Die gefundenen Werte sind anfänglich fast konstant $E = 1,15-1,35$, später aber, infolge der Permeabilitätsdifferenz, sehr verschieden.

Beispiel: Auf diese Weise wird eine Kurve für die Permeabilität von menschlichen Erythrocyten gegenüber isotonischer Glukose-lösung dargestellt. An der Ordinate trägt man die Extinktionswerte (E) und an der Abszisse die Zeit (T) ein. Das charakteristische Bild zeigt folgendes (Abb. 1).

Am Anfang (A) sinkt die Extinktionskurve während ca. 1 Stunde rapid ab (B). Dann verläuft sie eine Zeitlang unverändert (horizontal) weiter (B-C). Bei Punkt C fällt sie wieder rapid nach unten. Den niedrigsten Extinktionswert findet man nach ca. 4 Stunden. Diese «stufenförmige» Kurve deutet das Bestehen von verschiedenen Phasen des Permeabilitätsphänomens an und zeigt, daß die photometrische Methode viel vorteilhafter ist als die anderen, z. B. als Hämatokrit. In der oben genannten Kurve wird eine Volumen-

zunahme der Erythrocyten zwischen A und B nachgewiesen, die entweder durch Glukosepermeabilität der Erythrocyten oder einfach durch Glukoseadsorption an der Erythrocytenoberfläche bedingt wird. Zwischen B und C bleibt das Volumen der Erythrocyten unverändert.

Bei Punkt C sieht man schon von bloßem Auge eine Farbänderung in der untersuchten Flüssigkeit, wo die beginnende Hämolyse der Erythrocyten eintritt. Das letzte Stadium ist noch deutlicher durch Zentrifugieren nachzuweisen. Je weiter die Reaktion sich entwickelt, um so geringer ist die Erythrocytenzahl in der Lösung, und um so deutlicher ist auch die hämolytische Farbe.

2. *Messungen der Hämolyse und der Erythrocytendurchmesser.* Die Hämolyse wird hier auch mit dem Photometer gemessen. Für diesen Versuch wird eine Mischung von gleichen Volumen isotonischer Zuckerlösung und isotonischer NaCl-Lösung hergestellt.

Die Technik ist hier folgende:

0,1 cm³ Blut wird auf 1 cm³ NaCl.Na.citric.isot. und dann auf der obengenannten (NaCl-Glukose isot. *ānā*) Lösung gegeben, bis die Menge $(4E-1)\text{cm}^3$ (E = Erythrocytenzahl in 10⁶/cm³) entspricht, gut gemischt. Aus dieser Mischung verteilt man je 2 cm³ in 6–8 Reagenzgläsern von gleicher Größe und läßt sie im Brutschrank (bei 37° C), um die Temperatur konstant zu halten. Die eingeteilten Blutsuspensionsröhrchen werden in regelmäßigen Zeitabschnitten, z. B. 0,1...6 Stunden auf Hämolyse und Erythrocytendurchmesser hin untersucht. Für beide Versuche wird jedesmal ein Röhrchen der Blutsuspension gebraucht und zentrifugiert (5–10 Min.).

a) Die oben klare Flüssigkeit wird für die *Bestimmung der Hämolyse* benützt. Man mißt die Extinktion dieser Flüssigkeit in einer Cuvette von 5 mm Schichtdicke, Filter blau S₄₇.

Die Kurve der Hämolyse wird auch aus den gefundenen Extinktionswerten (E) unter bestimmten Zeitabschnitten (T) dargestellt.

b) Die nach dem Zentrifugieren sedimentierenden Erythrocyten werden für die *Messung der Erythrocytendurchmesser* benützt.

Durch diese Messung haben wir bewiesen, daß der Teil A–B in der Kurve der Abb. 1 eine Zunahme des Erythrocytenvolumens zeigt (Zunahme der Durchmesser).

Der Abschnitt C–D entspricht der Hämolyse der Erythrocyten; der mit D bezeichnete einer vollkommenen Hämolyse. (Deutliche Flüssigkeitsfarbe und keine Erythrocyten nach dem Zentrifugieren.)

3. *Bestimmung des Cholesterol- und Lecithin-Gehaltes der Erythrocyten.* Viele Autoren erklärten (Jacob, Wishart u. a.) die Permeabilität durch die Lipoidtheorie von Overton und waren der Meinung, daß der Permeabilitätsunterschied zwischen menschlichen und tierischen Erythrocyten z. B. bei Mensch und Kaninchen, durch die Verschiedenheit des Gehaltes der Erythrocyten an Cholesterol und Lecithin erklärt werden könne. Wir haben die Bestimmungsversuche dieser Substanzen am Kaninchen- und am Menschenblut ausgeführt.

Das Blut wird entnommen, Liquoid «Roche» beigelegt und gut zentrifugiert, um das Plasma von den Erythrocyten zu trennen. Die obere Schicht wird gänzlich abpipettiert. Der nach unten sedimentierte Erythrocytenbrei wird nochmals zentrifugiert, bis, wenn möglich, das gesamte Plasma frei von Erythrocyten ist. Es ist hier nicht nötig, die Erythrocyten zu waschen. Dann werden ca. 2 g Erythrocytenbrei abgewogen, in einen Erlenmeyer-Kolben gebracht und mit 2 cm³ Wasser nahezu hämolytisiert. Diese «Erythrocytenlösung» wird mit heißer Bloorscher Lösung (Aether-Alkohol 1 : 3) extrahiert, in einem 25cm³-graduierten Meßzylinder filtriert, indem wiederholt Alkohol-Aether zugelegt wird, bis das Volumen des Filtrates gerade 10. *P* (*P* = Gewicht der Erythrocyten in g) cm³ erreicht.

Für die Cholesterolbestimmung brauchen wir 5 cm³ Aether-Alkohol-Extrakt.

Für die Lecithinbestimmung brauchen wir 10 cm³ Aether-Alkohol-Extrakt.

1. *Die Bestimmung des Cholesterolgehaltes der Erythrocyten* wird mit Photometer folgendermaßen ausgeführt. 5 cm³ Aether-Alkohol-Extrakt werden in einer Porzellanschale auf einem Wasserbad trocken abgedampft und wieder in 5 cm³ Chloroform gelöst. Dann filtriert man es in einen Meßzylinder von 5 cm³ und wäscht die Porzellanschale und den Filter mit wenig Chloroform aus, bis ein Volumen von 5 cm³ im Meßzylinder bleibt. In dieser Lösung setzt man genau 2 cm³ Essigsäureanhydrid und 0,1 cm³ reine konz. Schwefelsäure zu. Nach Vermischen läßt man die Lösung 1–2 Min. stehen, dann mißt man mit dem Photometer in der Cuvette von 1 cm Schichtdicke mit Filter S₆₁. Von Minute zu Minute muß neu abgelesen werden, bis man den niedrigsten Extinktionswert erhält (*E*).

Berechnung:

$$\text{mg\% Cholesterol} = \frac{E \cdot 1,13 \cdot 100}{\text{Gewicht d. Erythro.}}$$

2. *Die Bestimmung des Lecithingehaltes der Erythrocyten.* 10 cm³ Aether-Alkohol-Extrakt werden in einem Vermischungskochkolben (50 cm³) durch Wasserbad bis zum Trocknen verdampft und 0,5 cm³ reine konz. Schwefelsäure zugelegt. Der Kolben wird auf kleiner Flamme erhitzt, bis ein dicker weißer Dampf aufsteigt und dann einige Minuten stehen gelassen. Nachher

werden 2–3 Tropfen konz. HNO_3 beigefügt und auf einer kleinen Flamme gelassen, bis sich ein brauner Dampf entwickelt. Dieses Verfahren muß so lange wiederholt werden, bis die Flüssigkeit farblos geworden ist. Nach Abkühlung fügt man 10 cm^3 destilliertes Wasser hinzu und läßt es bis zu ca. 2 cm^3 verdampfen. Dann wird dieser Inhalt in ein Zentrifugenglas gegossen und der Kolben mit $0,5 \text{ cm}^3$ dest. Wasser 3–4mal gewaschen. Man fügt $2,5 \text{ cm}^3$ mit Ammoniumnitrat gesättigte Lösung hinzu und kocht dieselben im siedenden Wasserbade 10 Minuten. Dann setzt man wieder 3 cm^3 5%iges Ammoniummolybdat zu und läßt noch 15 Min. lang im Wasserbade kochen. Der so entstandene Niederschlag muß in der Zentrifuge mehrmals mit Alkohol gewaschen werden. Endlich löst man denselben mit genau 5 cm^3 n/25 NaOH in einem Kolben auf und titriert mit n/25 H_2SO_4 zurück. (Phenolphthalein als Indikator.)

Berechnung:

$$\text{mg\% Lecithin} = \frac{(5-x) \cdot 4,4 \cdot 23,6}{\text{Gewicht d. Erythro.}}$$

x = die verbrauchte Menge von n/25 H_2SO_4

1. Unterschied der Glukosepermeabilität zwischen menschlichen und tierischen Erythrocyten. Wir betrachten zunächst die Zuckerpermeabilität der Erythrocyten, beginnend mit der Wirkung isotonischer Glukose auf Menschen-, Kaninchen- und Hundeblut.

Extinktionswerte

Nach Stunden	0	½	1	1½	2	2½	3	4	6	7	8
a) Mensch	1,29	1,17	1,05	1,02	1,02	1,01	1,00	0,78	0,13	0,09	0,07
b) Kaninchen	1,17	1,19	1,19	1,20	1,21	1,22	1,23	1,23	1,25	1,26	1,26
c) Hund	1,32	1,32	1,33	1,34	1,35	1,35	1,36	1,36	1,37	1,37	1,38

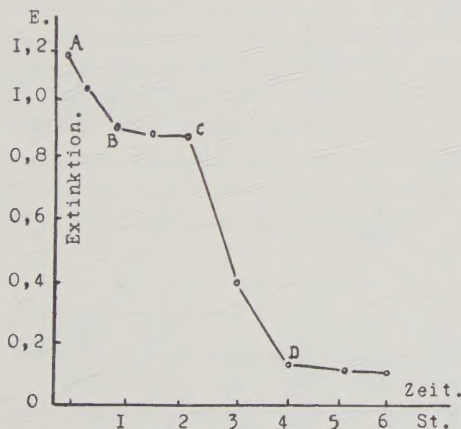


Abb. 1.

Die oben erwähnten Tatsachen, wonach die Zuckerpermeabilität der Erythrocyten je nach der Tierart verschiedene ist, erklärte *R. Höber* (1915) als physiologische Erscheinung oder als physiologische Differenz in den Eigenschaften der Zellmembran. Dieses Phänomen hatten schon *Masing* (1913) und *Kozawa* (1914) durch Hämatokritversuche bestätigt. Wir empfehlen hier die photometrische Methode.

Aus den Tabellen bzw. der Permeabilitätskurve (Abb. 2) ist ersichtlich, daß die menschlichen Erythrocyten, im Gegensatz zu den Erythrocyten des Kaninchens und des Hundes, für Glukose permeabel sind. Die menschlichen Erythrocyten schwellen in der isotonischen Glukoselösung stark an, während jene des Kaninchens und des Hundes in derselben Lösung ihre Durchmesser nicht ändern. Nach *Bechhold* besteht das Stroma der Erythrocytenmembran

Erythrocytendurchmesser in μ

Nach Stunden	N	0	$\frac{1}{2}$	1	$1\frac{1}{2}$	2	$2\frac{1}{2}$	3	4	5
a) Mensch	7,85	7,92	8,40	8,60	8,65	9,00	9,15	(Hämolyse)		
b) Kaninchen	6,57	6,53	6,47	6,48	6,48	6,50	6,48	6,46	6,47	6,47
c) Hund	7,94	7,96	7,97	7,95	7,94	7,90	7,90	7,82	7,72	7,72

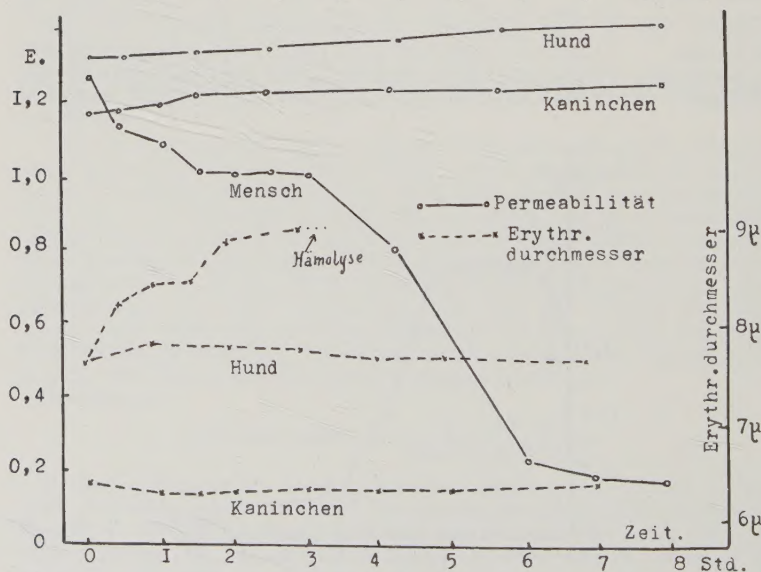


Abb. 2.

Der Cholesterol- und Lecithingehalt der Erythrocyten
(mg%/g)

Cholesterol	Lecithin
a) Mensch	
110, 111, 113, 120, 126, 129, 130	245, 246, 255, 251, 264, 244, 275
zwischen 110 und 130 mg%/g	zwischen 245 und 275 mg%/g
b) Kaninchen	
135, 140, 142, 146, 139	337, 323, 338, 340, 376
zwischen 135 und 146 mg%/g	zwischen 323 und 376 mg%/g
c) Hund	
139, 143	282, 288
zwischen 139 und 143 mg%/g	zwischen 282 und 288 mg%/g

hauptsächlich aus Proteinen und Lipoiden. Die Proteine bilden ein in der äußeren Grenzschicht befindliches Maschenwerk, welches unter Freilassung verschiedener mit semipermeablen Substanzen ausgefüllter Lücken, mit einer homogenen Mischung adsorbierter Lipide (Cholesterol+Lecithin) verputzt ist. Hier haben die verputzten Lipide eine große Bedeutung für die Permeabilität und die osmotische Resistenz (*Brinkmann, Jacob*).

In den chemischen Versuchen fanden wir, daß der Gehalt der Erythrocyten an Lecithin bei Menschen (245—275 mg%/g) niedriger ist als bei Kaninchen (323—376 mg%/g), obwohl der Cholesterolgehalt bei allen drei fast konstant ca. 130—146 mg%/g beträgt (beim Menschen etwas weniger). (*R. Iwatsura* [1923] hat dagegen keinen Unterschied zwischen dem Lecithingehalt der Erythrocyten der Menschen und jenem der Tiere gefunden.) Es ist möglich, daß die menschlichen Erythrocyten hier infolge geringeren Lecithingehaltes für Glukose permeabel sind. Da die Mischung adsorbierter Lipide in der äußeren Grenzschicht weniger verputzt ist, enthält die Eiweißphase relativ größere Poren, durch welche die Zuckermoleküle durchdringen.

2. Der Permeabilitätsunterschied menschlicher Erythrocyten bei verschiedenen Zuckerarten. 0,02 cm³ normales Menschenblut + 1 cm³

Zuckerlösung	Nach Stunden							
	0	1	2	3	4	6	7	8
Glukose	1,29	1,05	1,02	1,00	0,78	0,13	0,09	0,07
Lävulose	1,30	1,13	1,09	1,07	0,88	0,31	0,14	0,12
Xylose	1,30	0,16	0,12	0,10	0,09	0,09	0,06	
Lactose	1,34	1,44	1,46	1,38	1,38	1,33	1,33	
Maltose	1,28	1,33	1,33	1,32	1,32	1,31	1,31	
Saccharose . . .	1,32	1,36	1,40	1,44	1,44	1,45	1,45	

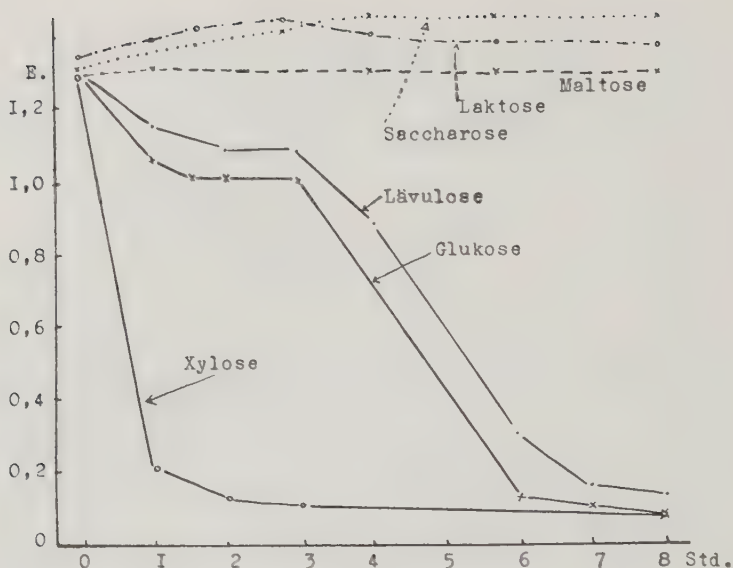


Abb. 3.

NaCl-Na.citric. isoton., dazu $(4E-1)$ cm³ isotonische Zuckerlösung von Glukose (5,4‰), Lävulose (5,9‰), Xylose (4,5‰), Lactose (10,8‰), Maltose (10,8‰) und Saccharose (10,2‰).

Aus diesen Versuchen ist folgendes ersichtlich:

A. Die menschlichen Erythrocyten sind
permeabel für Xylose, Glukose, Lävulose und
impermeabel für Lactose, Maltose und Saccharose.

Die oben genannten Permeabilitätsunterschiede sind von *Kozawa* (1914) durch die Hämatokritmethode bestätigt worden. Wir führten die Versuche hier nur mit der photometrischen Methode aus und erhielten außer dem gleichen Befund noch die folgende Erscheinung:

B. Der zeitliche Verlauf der Permeabilität einzelner untersuchter Zuckerarten ist sehr verschieden. Wir sind deshalb zur Ansicht gekommen, daß der Zucker erst von Erythrocyten oberflächlich adsorbiert wird, um dann langsam von der Oberfläche ins Innere zu dringen. Die verschiedenen Phasen können wie folgt eingeteilt werden:

a) *Adsorptionsphase* (Teil A-B der Kurve): Zuerst wird der Zucker an Erythrocyten oberflächlich adsorbiert.

b) *Permeabilitätsphase*: Der schon adsorbierte Zucker wird entweder infolge der physiologischen Funktion der Erythrocyten (z. B. Adsorption der Glukose durch menschliche Erythrocyten) oder infolge äußerer Einflüsse (z. B. Temperatursteigerung) allmählich in die Zellen eindringen. So ist es zu verstehen, daß das Anschwellen der Erythrocyten langsam vor sich geht (Teil A–B–C).

c) *Hämolysese*: Bei stärkerem Anschwellen verlieren die Zellen Hämoglobin, trennen sich die Stroma und gehen vollständig in die Zuckerlösung über (mikroskopisch sind nur die farblosen Blut-schatten sichtbar) (Teil C–D).

d) *Stromatolyse*: Schließlich wird auch das Stroma gelöst und ist optisch nicht mehr nachweisbar.

Bei Xylose sind die ersten 3 Phasen infolge der raschen Permeabilität nicht voneinander zu unterscheiden.

3. *Die Glukosepermeabilität der menschlichen Erythrocyten bei Diabetes mellitus*. 0,02 cm³ Blut + 1 cm³ N.N. (NaCl–Na.citric. isoton.) + 4(E–1)cm³ Glukose isoton.

- a) Kontrolle (Gesunder) Erythro. 4,6 Mill. Blutzucker 320 mg%
- b) Diabetiker (Fr. St.) Erythro. 4,37 Mill. Blutzucker 320 mg%
- c) Diabetiker (Fr. L.) Erythro. 3,8 Mill. Blutzucker 256 mg%
- d) Diabetiker (Herr Br.) Erythro. 4,5 Mill. Blutzucker 200 mg%

Extinktionswerte

Nach Stunden	0	1	2	3	4	5	7	8	9
a) Kontrolle	1,28	1,05	1,02	0,80	0,52	0,09	0,07	0,07	
b) Diabetiker	1,26	1,02	1,00	0,46	0,11	0,07	0,07	0,06	
c) Diabetiker	1,28	1,04	1,02	0,70	0,18	0,16	0,16		
d) Diabetiker	1,20	1,06	0,92	0,70	0,28	0,08	0,08	0,07	

Auf Grund dieser Versuche ist keinesfalls anzunehmen, daß die Zuckerpermeabilität der Erythrocyten von der Konzentration des Plasmazuckers abhängig ist. Die ähnlichen Befunde von *Frank* und *Fretschneider* (1912), wonach bei Adrenalin-Hyperglykämie der Zuckergehalt der RBK kaum vermehrt ist, wurden von *Höber* (1912) bestätigt und dahin erweitert, daß sowohl bei der alimentären Hyperglykämie als auch bei jener, die sich im Anschlusse an die Pancreasextirpation entwickelt, die Blutkörperchen keineswegs der erhöhten Plasmakonzentration entsprechend mehr Zucker aufnehmen.

III. Die Permeabilitätsveränderungen unter dem Einfluß verschiedener Faktoren

1. *Temperatur.* Zuerst wird die Einwirkung der Temperatur auf die Zuckerpermeabilität der menschlichen Erythrocyten erörtert. Die Arbeiten von *Masing* (1914) und *Wiechmann* (1921) haben es ermöglicht, festzustellen, daß die Glukose bei Temperaturanstieg in großer Menge durch menschliche Erythrocyten aufgenommen und somit ein Temperaturquotient ausgedrückt wird. Bei hoher Temperatur tritt eine Wärmehämolyse ein. Die Lipidoberflächenschicht der Erythrocyten beginnt bei 51° C zu schmelzen und zeigt bei 62° eine komplette Hämolyse (*Albrecht* [1920]).

Permeabilität: Wir beobachten hier die Permeabilitätsveränderung nur bei mäßigem Temperaturanstieg und das Blut (menschliche Erythrocyten) wurde unter gleichen Bedingungen mit isotonischer Glukose untersucht.

Grad Celsius	Nach Stunden								
	0	1	2	3	3½	6	7	8	9
4	1,30	1,18	1,16	1,16	1,16	1,14	1,14	1,14	0,06
18,5	1,30	1,15	1,13	1,12	1,12	1,04	1,04	1,04	
30	1,31	1,07	1,05	1,05	1,04	0,17	0,09	0,09	
37	1,30	1,05	1,03	1,00	0,78	0,13	0,09	0,07	
40	1,31	10,4	1,02	0,62	0,37	0,08	0,06	0,06	

Durch Einwirkung der Temperatur wird die Zuckerpermeabilität der Erythrocyten stark verändert. Die menschlichen Erythrocyten sind bei 4° (im Eisschrank) und bei 18,5° (Zimmertemperatur) für Glukose wenig permeabel, dagegen wohl bei mäßigem Temperaturanstieg, z. B. bei 30°. Bei einer Temperatur von etwas mehr als 37° und bis 40° tritt die Permeabilität merklich rascher ein.

2. *Insulin.* Das Insulin spielt nicht nur beim Kohlenhydratstoffwechsel eine große Rolle, vielmehr wird auch hier sowohl in vitro als auch in vivo gezeigt, daß es auch die Permeabilität der Erythrocyten beeinflußt, insofern als es den Eintritt der Zuckermoleküle in die Erythrocyten begünstigt.

A. *Insulin in vitro.*

a) *Auf die Glukosepermeabilität der menschlichen Erythrocyten.* Je 0, 1, 2, 4, 8 Tropfen der mit physiologischer NaCl 10fach verdünnten Insulinlösung (Insulin «Sandoz») werden 0,02 cm³ Menschenblut + 18 cm³ Glukose isoton. beigefügt (1 Tropfen = 0,2 Einheiten).

Permeabilität

Anzahl Insulin- Tropfen	Nach Stunden								
	0	½	1	1½	2	2½	3	6	7
0	1,22	1,12	1,02	1,00	0,96	0,96	0,90	0,19	0,11
1	1,18	1,00	0,93	0,93	0,92	0,92	0,52	0,07	0,07
2	1,16	1,00	0,03	0,93	0,90	0,90	0,48	0,07	0,07
4	1,15	0,99	0,94	0,94	0,90	0,90	0,45	0,07	0,08
8	1,14	0,99	0,94	0,94	0,90	0,90	0,45	0,09	0,09

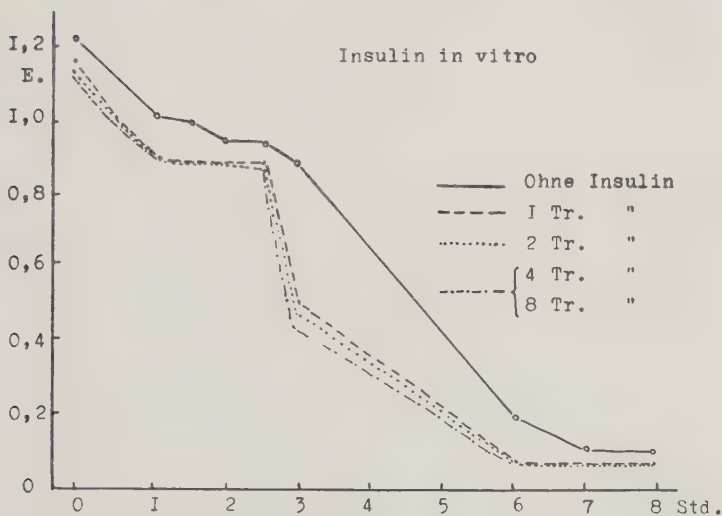


Abb. 4.

Hämolyse und Erythrocytendurchmesser

Anzahl Insulin- Tropfen		Nach Stunden					
		0	1	2	3	5	6
0	Hämolyse	0,187	1,12	2,39	2,60	—	
	Durchmesser μ	7,88	8,04	7,56	—	7,46	
1	Hämolyse	0,174	1,26	2,60	2,80	—	
	Durchmesser μ	8,06	8,14	7,78	—	7,54	
2	Hämolyse	0,187	1,40	2,58	3,00	—	
	Durchmesser μ	8,10	8,26	7,80	—	7,56	

Dieser Versuch zeigt, daß die Glukosepermeabilität der menschlichen Erythrocyten durch Insulin deutlich gesteigert wird. Die

Erythrocyten werden bei Insulineinwirkung sofort vergrößert und frühzeitig hämolysiert. Der Mechanismus der gesteigerten Permeabilität kann als die Folge der vermehrten Glukoseadsorption angesehen werden. Ob das Insulin tatsächlich die Zuckeradsorption an Erythrocyten fördert, haben wir direkt mit isotonischer Saccharose in folgenden Reagenzversuchen geprüft:

b) *Auf die Saccharoseadsorption menschlicher Erythrocyten.*

1. 0,1 cm³ Menschenblut + 18 cm³ Saccharose isoton. (10,25%)
2. 0,1 cm³ Menschenblut + 18 cm³ Saccharose isoton. +
2 Tropfen Insulin.

Beide Mischungen werden gleichmäßig in 6 Reagenzgläsern verteilt und auf Erythrocytendurchmesser hin untersucht.

Nach Stunden	0	¼	½	¾	1	2
Ohne Insulin	7,26	7,12	6,94	6,86	6,86	6,88
Mit 2 Tropfen Insulin. . . .	8,04	8,16	8,22	8,02	7,78	7,80

Die durch Insulin beeinflussten Erythrocyten sind in der isotonischen Saccharoselösung auch vergrößert, und um die einzelnen Blutkörperchen ist ein schmaler dunkler Saum (Zuckerschicht) im Ausstrichpräparat mikroskopisch nachweisbar.

Blutsuspension im Reagenzglas. Noch interessanter ist der makroskopische Befund der Blutsuspension im Reagenzglas. Durch die Einwirkung des Insulins sind die Erythrocyten miteinander agglutiniert und die suspendierten Erythrocyten nicht mehr homogen im Reagenzglas verteilt. Diese Erythrocytenpartikelchen sind grobfleckig und eher am Rande oder auf dem Grund des Reagenzglases zu finden.

Mikroskopisch sind die Erythrocyten in der Insulin-Saccharose-Lösung miteinander agglutiniert.

Hier haben wir wohl bewiesen, daß das Insulin tatsächlich die Adsorption von Zucker, und zwar nicht nur von Glukose, sondern auch von Saccharose, an Erythrocyten fördert. Da die menschlichen Erythrocyten für Saccharose eigentlich impermeabel sind, erreicht die Insulineinwirkung hier eine vermehrte Adsorption.

c) *Auf die Glukoseadsorption der Kaninchenerythrocyten.* 0,02 cm³ Kaninchenblut + 18 cm³ Glukose isoton. + 1 Tropfen Insulin.

Trotzdem die Kaninchenerythrocyten für Glukose impermeabel sind, fördert das Insulin doch eine Adsorption von Glukose an Blutkörperchen, und es konnte hier eine Vergrößerung des Erythrocytenschattens nachgewiesen werden.

Insulin 1 Tropfen = 2 E.

Zeit in Min.	0	5	0	5	10	15	20	25
Extinktion	1,10	1,10	1,10	1,10	1,09	1,08	1,07	1,07
Zeit in Min.	35	40	45	50	55	60	70	80
Extinktion	1,06	1,04	1,03	1,06	1,08	1,09	1,11	1,13
Zeit in Min.	90	100	120					
Extinktion	1,14	1,15	1,16					

Erythrocytendurchmesser

Insulin

Zeit (Min.) ↓	0	30	60	90	120
6,64 μ	7,06 μ	7,30 μ	6,86 μ	6,86 μ	6,80 μ

Permeabilität

Fall 1.

Zeit	0	1	2	3	5	6	Blutzucker
Vor Injektion	1,25	1,00	0,96	0,58	0,13	0,17	246 mg%
¼ Std. nach	1,23	0,95	0,93	0,55	0,13	0,18	
½ Std. nach	1,23	0,79	0,79	0,42	0,12	0,18	243 mg%
1 Std. nach	1,23	0,82	0,82	0,49	0,12	0,18	241 mg%

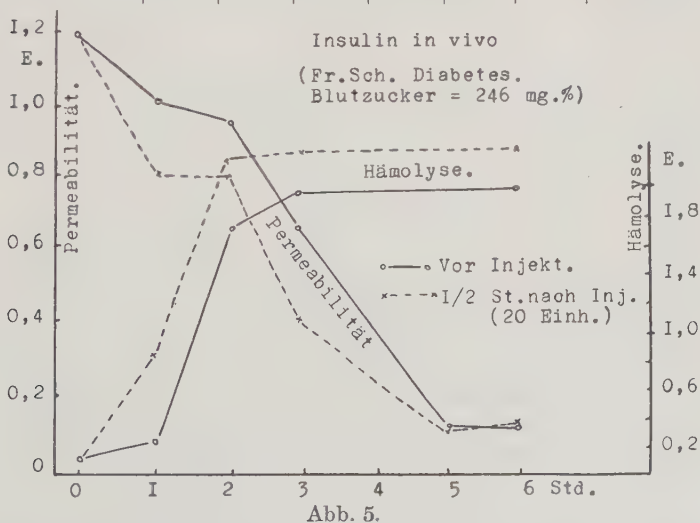


Abb. 5.

B. *Insulin in vivo.*

a) *Versuch am Menschen.* Hier wird in zwei Fällen Insulin subcutan injiziert (20 E.). Das Blut wird einige Minuten vor der

Fall 2.

Zeit	0	1	2	3	4	5½	6	Blut- zucker mg%
Vor Injektion	1,25	1,00	0,85	0,82	0,42	—	0,01	128
½ Std. nachher	1,06	0,82	0,82	—	—	0,09		123
1 Std. nachher	1,05	0,84	0,82	—	—	0,01		122
2 Std. nachher	1,09	0,84	—	—	0,01	—		120

Die Permeabilitätserscheinung ist ½ Stunde nach der subcutanen Insulininjektion am deutlichsten.

Hämolyse

Nach Stunden	0	1	2	3	5½	6
<i>Fall 1:</i>						
Vor Insulin-Injektion	0,108	0,204	1,70	1,92	—	2,00
½ Std. nachher	0,108	0,824	2,15	2,20	—	2,20
<i>Fall 2:</i>						
Vor Insulin-Injektion	0,102	0,114	0,47	1,60	—	1,62
½ Std. nachher	0,137	0,300	1,23	1,95	1,85	—

Erythrocytendurchmesser in μ

Nach Stunden	0	1	2	3	6
<i>Fall 1:</i>					
Vor Insulin-Injektion	7,74	8,10	8,06	7,76	7,77
½ Std. nachher	8,04	8,52	7,92	7,88	7,60
<i>Fall 2:</i>					
Vor Insulin-Injektion	7,96	8,54	8,68		
½ Std. nachher	8,60	8,82	8,85		

Injektion und ¼, ½ und 1 Stunde nach der Injektion aus dem Finger entnommen und auf Permeabilität, Hämolyse und Erythrocytendurchmesser hin untersucht.

Durch diese Versuche haben wir bewiesen, daß *Insulin auch in vivo die Glukosepermeabilität menschlicher Erythrocyten steigert*. Die sofortige Vergrößerung der Erythrocyten kann auf die vermehrte Glukoseadsorption zurückgeführt werden. *Lowi* (1927) hat schon festgestellt, daß die bei Insulineinwirkung zu beobachtende vermehrte Zuckeraufnahme nicht nur an den intakten Blutkörperchen, sondern auch am Stroma, an den Kernen von Vogeler erythrocyten und an Gewebeprei festzustellen ist.

Damit ist natürlich eine Permeabilitätstheorie des Diabetes unter Insulineinwirkung in keiner Weise ausgeschlossen, da die vermehrte

Adsorption bei Insulineinwirkung der einleitende Prozeß sein kann, der eine Erhöhung der Permeationsgeschwindigkeit des Zuckers begünstigt, d. h. die Zuckerpermeabilität wird hier durch Insulin indirekt gesteigert.

3. *Thyroxin*. Auf Grund der Versuche von *Eppinger* und *Asher* (1927), die bei Tieren, denen die Schilddrüse entfernt worden war, eine wesentlich schwächere NaCl-Diurese als bei den Kontrolltieren beobachten konnten, hat *Gellhorn* (1928) in seinem Versuch mit Muskelmembran festgestellt, daß das Inkret der Schilddrüse (Thyroxin) die Glukosepermeabilität an der Muskelmembran steigert. Es kann auch ein Einfluß von Thyroxin auf die Glukosepermeabilität der menschlichen Erythrocyten sein. In den folgenden Versuchen werden je 0, 0,01, 0,02, 0,04, 0,08 mg Thyroxin (mit physiolog. NaCl verdünnter Lösung), 0,02 cm³ Menschenblut + 18 cm³ Glukose isoton. beigefügt und auf Permeabilität, Hämolyse und Erythrocytendurchmesser hin untersucht.

Hier wird klar bewiesen, daß das Thyroxin von geringer Konzentration, z. B. bis zu einer Verdünnung 1:1 800 000 (0,01 mg auf 18 cm³ Glukose) auch auf die Glukosepermeabilität der Erythrocyten steigernd wirkt. Der Mechanismus besteht möglicher-

Permeabilität

Zeit	Kontrolle (ohne Thyroxin)	Thyroxin			
		0,01 mg	0,02 mg	0,04 mg	0,08 mg
0 = E	1,18	1,18	1,09	1,09	1,06
1	1,00	0,94	0,93	0,89	0,87
2	0,77	0,63	0,60	0,60	0,60
3	0,45	0,35	0,35	0,34	0,33
5	0,09	0,08	0,08	0,07	0,05
6	0,09	0,08	0,09	0,08	0,07

Hämolyse und Durchmesser

Zeit Std.	Hämolyse «E»		Durchmesser in μ	
	ohne Thyroxin	0,08 mg Thyroxin	ohne Thyroxin	0,08 mg Thyroxin
0	0,08	0,11	7,88	8,38
1	0,14	0,20	8,14	8,46
2	1,00	1,52	8,40	8,06
3	1,39	1,85	7,40	8,00
5	1,69	1,88	7,40	7,62
6	1,69	1,88	7,36	7,40

weise wie beim Insulin zuerst in einer vermehrten Adsorption von Glukose an Erythrocyten, die dadurch die Permeabilität steigert. Die Erythrocytendurchmesser sind bei Thyroxineinwirkung größer als ohne Thyroxin.

4. *Physostigmin und Atropin*. Pharmakologisch und klinisch wirken die beiden vegetativen Gifte antagonistisch. *Lowi* und *Solti* (1924) haben den Einfluß dieser Stoffe auf die Phosphorsäureausscheidung des Muskels untersucht und dabei eine Permeabilitätssteigerung durch Physostigmin sowie eine Herabsetzung durch Atropin festgestellt. Hier haben wir direkte Untersuchungen über die Glukosepermeabilität der durch diese beiden Stoffe beein-

Permeabilität

Zeit Std.	Kontrolle	Atropin (0,05 cm ³ , 0,1 mg%) Konz. 1:360000	Physostigmin (0,05 cm ³ , 0,1 mg%) Konz. 1:360000
0	1,18	1,19	1,18
1	1,00	1,05	0,93
2	0,98	1,04	0,94
3	0,58	0,69	0,19 (3½ Std.)
4	0,23	0,32	0,14
6	0,12	0,14	0,14
7	0,13	0,13	0,13

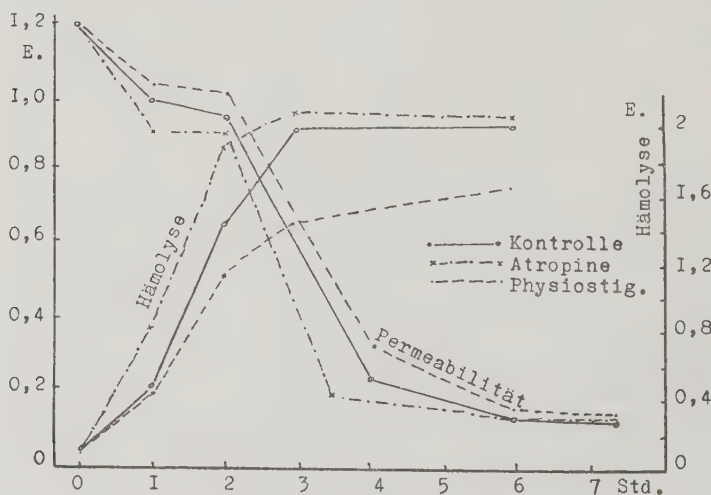


Abb. 6.

Hämolyse

Zeit Std.	Kontrolle	Atropin 0,1 mg%, 0,05 cm ³	Physostigmin 0,1 mg%, 0,05 cm ³
0	0,114	0,113	0,102
1	0,45	0,45	0,79
2	1,42	1,12	1,82
3	2,00	1,42	2,10
6	2,10	1,60	2,10

Erythrocytendurchmesser in μ (normal = 7,72)

Zeit Std.	Kontrolle	Atropin	Physostigmin
0	8,06	7,80	8,14
1	8,24	7,88	8,30
2	7,96	7,94	7,80
3	7,52	8,00	7,60
5	7,52	7,66	7,56
6	7,54	7,58	7,56

flußten Erythrocyten angestellt. 0,05 cm³ der mit physiologischer NaCl verdünnten 0,1 mg% Lösungen von Atropin und Physostigmin werden 0,02 cm³ Menschenblut + 18 cm³ Glukose isoton. beigefügt.

Dieses Resultat ergibt den Beweis, daß durch Zusatz beider vegetativer Mittel die Zuckerpermeabilität der Erythrocyten geändert werden kann, und zwar ist die Wirkung des Atropins derjenigen des Physostigmins entgegengesetzt. In den Tabellen wird gezeigt, daß durch Physostigmin 1 : 360 000 eine Steigerung der Permeabilität der Erythrocyten für Glukose bewirkt wird, während Atropin in gleicher Konzentration die Zuckerpermeabilität der Erythrocyten vermindert. Die Hämolyse und die Erythrocytendurchmesser sprechen für diese Erscheinung. Durch Physostigmin werden die Erythrocyten infolge der Permeabilitätszunahme vergrößert und frühzeitig hämolysiert. Umgekehrt bleibt ihr Anfangsvolumen nach Atropinzusatz unverändert.

5. *Vitamin «P»*. Vitamin P ist ein Flavononglukosid und besitzt die Fähigkeit (Citrin von *Szent Györgyi*), die Permeabilität der Kapillarwände zu vermindern. Ueber die tatsächliche Bedeutung dieses Vitamins herrscht bei den kompetenten Forschern in letzter Zeit keine Uebereinstimmung. *Parrot* und *Gabe* (1947) behaupten in ihrer Arbeit, daß eine Steigerung der Resistenz der Erythrocyten gegen osmotische Hämolyse durch Vitamin P festgestellt wird.

Auf dieser Basis kann ein Einfluß von Vitamin P auf die Zuckerpermeabilität der Erythrocyten erwartet werden. In den folgenden Versuchen wird das «Citrin Roche»¹ verwendet. Wir verwendeten eine 0,1% Citrinlösung (in 0,9% NaCl isoton.), welche durch Zusatz von wenigen n/6,5 NaOH gut gelöst und später mit gleichem Volumen n/6 HCl wieder neutralisiert wurde. 0,5 cm³ dieser 0,1% Citrinlösung wird 0,02 cm³ Menschenblut + 18 cm³ Glukose isoton. beigefügt.

a) Permeabilität

Std.	0	½	1	1½	2¼	3	3½	5½	6½
Ohne Citrin	1,20	1,09	0,95	0,86	0,86	0,78	0,53	0,05	0,05
Mit Citrin	1,21	1,15	1,06	0,94	0,95	0,85	0,60	0,09	0,06

b) Hämolyse und Durchmesser

Zeit Std.	Hämolyse «E»		Durchmesser in μ	
	ohne Citrin	mit Citrin	ohne Citrin	mit Citrin
0	0,027	0,009	N = 7,80	N = 7,80
1	0,229	0,206	7,60	7,54
2	1,409	1,39	7,96+	7,46
3			7,80+	7,38
5	1,824	1,74	7,46+	7,20
6	1,85	1,74	6,94+	7,00

Die Citrin-Konzentration 1 : 36 000 bewirkt eine Verminderung der Glukosepermeabilität. Die Erythrocyten werden durch diese Citrinlösung in Glukoselösung nicht hämolysiert und von Anfang an bis zu 6 Stunden allmählich verkleinert.

Es besteht hier die Möglichkeit, daß das Vitamin P die Resistenz der Erythrocyten gegen osmotische Hämolyse steigert (*Parrot, Gabe* [1947]) und wie CaCl₂ auf die Zellmembran abdichtend wirkt (*Szent Györgyi* [1946]); somit wird die Zuckerpermeabilität durch dieses Vitamin herabgesetzt.

Zusammenfassung. Die Verwendung des Pulfrich-Photometers für die Messung der Permeabilität der Erythrocyten wird bespro-

¹ Der Firma Hoffmann-La Roche in Basel danken wir für die freundliche Ueberlassung der nötigen Versuchsmengen «Citrin».

chen. Die mit isotonischer Zuckerlösung erzielte Blutverdünnung bei gleicher Erythrocytenzahl ergibt Extinktionswerte, die von der Größe der Erythrocyten abhängen. Die Kurve für Extinktionswerte entspricht dem Permeabilitätsphänomen, welches man mit Erythrocytendurchmesser und Hämolyseversuchen vergleichen kann.

Die *Permeabilitätsunterschiede* zwischen den Erythrocyten des Menschen und jenen des Kaninchens können auf die Differenzen in den Eigenschaften der Erythrocytenmembran, insbesondere auf das verputzte Lecithin zurückgeführt werden. Der Lecithingehalt der menschlichen Erythrocyten beträgt 245–275 mg%, jener der Kaninchen dagegen 323–376 mg%. Der Gehalt beider an Cholesterol ist fast konstant und beträgt 130–146 mg%.

Wir haben die Permeabilitätsunterschiede der Erythrocyten bei Diabetes mellitus gegenüber der Norm nicht feststellen können.

Durch die Einwirkung der *Temperatur* wird die Zuckerpermeabilität der menschlichen Erythrocyten geändert. Die Glukosepermeabilität ist bei einer Temperatur von 4–18° C gering, bei einer solchen von 30–40° C dagegen gut. Die Zunahme der Permeabilität steht in einem direkten Verhältnis zum Temperaturanstieg.

Das *Insulin* bewirkt sowohl in vitro als auch in vivo eine Steigerung der Glukosepermeabilität menschlicher Erythrocyten. In vitro wird nach Insulinzufuhr eine vermehrte Adsorption von Glukose, Xylose, Saccharose u. a. Zuckerarten an Erythrocyten festgestellt. Die Kaninchenerythrocyten binden Zucker überhaupt nur bei Vorhandensein von Insulin.

Daß das Inkret der Schilddrüse, *Thyroxin*, permeabilitätssteigernd wirkt, ist durch unsere Versuche an menschlichen Erythrocyten direkt bewiesen worden.

Physostigmin hat eine dem *Atropin* entgegengesetzte Wirkung auf die Zuckerpermeabilität. Es kann festgestellt werden, daß das Physostigmin in einer Verdünnung von 1:360 000 eine Steigerung der Zuckerpermeabilität der menschlichen Erythrocyten bewirkt, Atropin dagegen in der gleichen Konzentration die Zuckerpermeabilität der Erythrocyten vermindert.

Das *Vitamin «P» (Citrin Roche)* bewirkt ebenfalls eine Herabsetzung der Glukosepermeabilität und erhöht die Resistenz gegen Hämolyse.

Zum Schlusse gestatte ich mir, Herrn Prof. Dr. A. Gigon sowie Herrn Chemiker M. Noverraz für die lebenswürdige Anregung und die vielen Ratschläge bei der Durchführung dieser Arbeit meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Beiler, J. M., und Martin, J. J.: Biochem. J. (Brit.) **1947**, 507. – *Berczeller, L.*: Biochem. J. (Brit.) **133**, 509 (1922). – *Bruckmann und Van Dam*: Arch. internat. Physiol. **15**, 105 (1911). – *Collander, R.*: Arch. physiol. scand. **1947**, 152. – *Ege, R.*: Arch. néerld. Physiol. **107**, 246 (1920). – *Eppinger*: Zur Pathologie und Therapie des menschlichen Oedems, 1929, S. 87. – *Hamburger und Rubanovic*: Arch. internat. Physiol. **10**, 1 (1910). – *Höber, R.*: Permeability of Erythrocytes to Nonelectrocytes. 1946, 237. – *Iwatsuru, R.*: Arbeitssammlung Med. Klin. Univ. Osaka (Japan) **1937**, 178. – *Jacob, M. H.*: Biol. Bull. Mar. biol. Labor., Woods Hole (Am.) **58**, 104 (1930); J. cellul. a. comp. Physiol. (Am.) **1934**, 4, 161; Amer. Naturalist **62**, 289 (1935). – *Jendrassik, L., und Andik, J.*: Klin. Wschr. **1943**, 142. – *Kozawa, S.*: Zbl. Physiol. **27**, Nr. 15 (1913); Beiträge zum arteigenen Verhalten der RBK. (zit. nach Arbeitssammllg Med. Klin. Univ. Osaka, Japan). – *Lowi, O.*: Klin. Wschr. **1927**, 2169. – *Michaelis, L., Ellsworth und Weech*: J. gen. Physiol. **1927**, 10, 671. – *Naegeli, O.*: Blutkrankheiten und Blutdiagnostik **1943**, 212. – *Netter, H.*: Pflügers Arch. **222**, 724 (1924). – *Netter, H., und Orskow, S.*: Pflügers Arch. **231**, 135 (1932). – *Orskow, S. L.*: Biochem. Z. **279**, 241 (1935); **269**, 349 (1934). – *Parpart, A. K.*: J. cellul. a. comp. Physiol. (Am.) **1930**, 7, 153. – *Parrot, J. L., und Gabe, M.*: Lab. Bouc. C. r. Soc. Biol. **141**, 7/8, 363 (1947). – *Powder, E.*: The Mammalian Red Cell **1934**, 42. – Roche Compendium **1948**, 173, 257, 615. – *Rona und Sperling*: Roche Compendium **1926**, 175, 253. – *Rona*: Roche Compendium **1926**, 31, 215. – *Tinker, Fr.*: Proc. Soc. Med., Lond. **92**, 357 (1916). – «Vitamin P» in Dtsch. med. Wschr. **1937**, Inseratenseite 10, Nr. 11. – *Szent-Györgyi, A.*: Bull. Acad. Méd. Roum., Bucarest (Fr.) **1937**, 3, 17. – *Wilbrandt, W.*: Untersuchungen der Ionenpermeabilität der RBK. Habilitationsarbeit, Univ. Bern, **1938/42**, 300, 535.

Curriculum vitae

Ich, Tschau-Tjiän Yang, wurde am 28. Januar 1915 in Siang-tan (Hunan), China, geboren. Nach 6 Jahren Volksschule besuchte ich die Li-ta Mittelschule in Shanghai, wo ich im Juli 1933 das Reifezeugnis erhielt. Hierauf erlernte ich in der der Staatlichen Tung-Chi Universität Shanghai angegliederten Schnellklasse die deutsche Sprache. Nach dort bestandener Prüfung studierte ich an der medizinischen Fakultät der Staatlichen Tung-Chi Universität. Im Januar 1937 legte ich dort das Physikum und im Juli 1939 das ärztliche Staatsexamen ab. Mein Praktikantenjahr leistete ich an der Klinik der genannten Universität, worauf ich im Juli 1940 die Approbation erhielt. Von 1940 bis 1944 arbeitete ich als regulärer Assistent in der medizinischen Abteilung der Klinik der Tung-Chi Universität. 1944 wurde ich an der medizinischen Fakultät der genannten Universität zum Dozenten für Innere Medizin ernannt, und habe bis zu meiner Abreise in die Schweiz, Tropenkrankheiten und Infektionskrankheiten gelesen.

Von Juli 1948 bis Juli 1949 war ich als Volontär-Assistent bei Herrn Prof. Dr. A. Gigon in der Medizinischen Universitätspoliklinik Basel tätig.

Im April 1949 erwarb ich das Diplom für Tropenmedizin des Schweizerischen Tropeninstitutes, Basel.

Im September 1948 wurde ich anlässlich der Gründung der Internationalen Gesellschaft für Innere Medizin zum Vertreter Chinas in das internationale Komitee dieser Gesellschaft gewählt.

